

## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT



REC'D	21 APR 1997
WIPO	PCT

## Bescheinigung

Die Anmelderin Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts in Heidelberg/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Regulierung des Spermatogenese"

am 9. Februar 1996 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole A 61 K und G 01 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 27. Februar 1997  
 Der Präsident des Deutschen Patentamts  
 Im Auftrag

Aktenzeichen: 196 04 773.0

Schulenburg



Deutsches Krebsforschungszentrum  
Stiftung des öffentlichen Rechts  
Im Neuenheimer Feld  
69120 Heidelberg  
Unser Zeichen: K 2291 - hu/cs

### **Regulierung der Spermatogenese**

Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Regulierung der Spermatogenese und ein Verfahren zur Untersuchung der Spermatogenese sowie einen hierfür verwendbaren Kit.

Mit Spermatogenese wird die Entwicklung von Spermien bezeichnet. Ein Eingreifen in die Spermatogenese ist wünschenswert, wenn sie gestört ist und nicht zu funktionsfähigen Spermien führt. Andererseits könnte ein Eingreifen in die Spermatogenese auch genutzt werden, um eine Fertilitätskontrolle beim Mann durchzuführen.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem die Spermatogenese reguliert werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenständige in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit eine pharmazeutische Zusammensetzung, die sich zur Regulierung der Spermatogenese eignet. Eine solche Zusammensetzung umfaßt:

- (a) zur positiven Regulierung  
ein oder mehr Stoffe von  
CREM, einer CREM-phosphorylierenden Verbindung und einer  
die Expression von CREM induzierenden Verbindung,  
und/oder
  
- (b) zur negativen Regulierung  
ein oder mehr Stoffe von  
einer CREM-hemmenden Verbindung, einer die Phosphory-

lierung von CREM hemmenden Verbindung und einer die Expression von CREM hemmenden Verbindung.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß CREM (cAMP responsive element modulator) ein entscheidender Regulator der Spermatogenese ist. Der Anmelder hat gefunden, daß CREM ein Transkriptionsfaktor ist, der die Expression von an der Spermatogenese beteiligten Proteinen kontrolliert. Diese Proteine werden in der vorliegenden Anmeldung als CREM-abhängige Proteine bezeichnet. Beispiele solcher sind Proacrosin, Protamin, Tp-1 (transision protein-1) MCS (mitochondrial capsule seleno protein) und RT7 (mill germ cell specific protein). Findet sich eine CREM-Defizienz, d.h. ist CREM nicht oder nur vermindert bzw. nicht in phosphorylierter Form exprimiert, wodurch vorstehende Proteine ebenfalls nicht oder nur vermindert exprimiert sind, liegt eine gestörte Spermatogenese vor, die zu funktionsunfähigen Spermien führt.

In einer pharmazeutischen Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung betrifft der Ausdruck "eine CREM-phosphorylierende Verbindung" jegliche zur Phosphorylierung von CREM geeignete Verbindungen, insbesondere Kinasen. Ferner betrifft der Ausdruck "eine die Expression von CREM induzierende Verbindung" jegliche Verbindungen, die direkt oder indirekt die Expression von CREM induzieren können. Des Weiteren betrifft der Ausdruck "eine CREM-hemmende Verbindung" jegliche zur Hemmung von CREM geeignete Verbindungen, insbesondere gegen CREM-gerichtete Antikörper. Darüberhinaus betrifft der Ausdruck "eine die Phosphorylierung von CREM hemmende Verbindung" jegliche Verbindungen, die zur Hemmung der Phosphorylierung von CREM geeignet sind. Solche Verbindungen sind insbesondere Kinase-Inhibitoren, wie H7, H8, H89, HA 1004 und Walsh-Inhibitor. Weiterhin betrifft der Ausdruck "eine die Expression von CREM hemmende Verbindung" jegliche Verbindungen, die direkt oder indirekt die Expression von CREM hemmen können.

Der Fachmann weiß, wie er bestimmen kann, welche der für eine pharmazeutische Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung genannten Stoffe und welche Mengen davon sich für die Spermatogenese-Regulierung bei einem einzelnen Probanden am besten eignen. Für den Fachmann bietet sich z.B. folgendes an: Herstellung einer transgenen Maus, die in runden Spermatiden des Hodens eine induzierbare CREB (cyclic AMP responsive element binding protein)-Mutante exprimiert. Diese Mutante dimerisiert mit CREM, wobei die Mutante gegenüber CREM dominant-negativ ist, d.h. CREM wird durch Dimerisierung mit dominant-negativem CREB inhibiert. Die transgene Maus ermöglicht daher die Bestimmung von Stoffen und deren Mengen, die Einfluß auf CREM und somit auf die Spermatogenese haben.

Zur Herstellung der transgenen Maus bietet sich an, in befruchtete Eizellen einer Maus einen Vektor einzuführen, der einen die Genexpression in runden Spermatiden ermöglichen Promotor, wie den Protamin-Promotor (vgl. Zambrowicz, B.P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, (1990), 5071-5075), enthält. Unter der Kontrolle dieses Promotors steht eine DNA, die für ein Fusionsprotein aus dem mutierten CREB und einer veränderten Liganden-Bindungsdomäne des menschlichen Progesteronrezeptors kodiert (vgl. Wang, Y, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, (1994), 8180-8184). Das mutierte CREB weist an der Position 133 nicht Serin sondern Alanin auf und kann daher nicht phosphoryliert werden, was den Verlust seiner Transkriptionsaktivität bedeutet. In der veränderten Liganden-Bindungsdomäne des menschlichen Progesteronrezeptors fehlen die Aminosäuren 892-933, wodurch diese Liganden-Bindungsdomäne nicht mehr durch Progesteron sondern nur noch durch den Liganden RU 486 gebunden werden kann. Durch letzteren wird das mutierte CREB im Fusionsprotein aktiviert.

Erfindungsgemäß wird auch ein Verfahren bereitgestellt, das sich zur Untersuchung bzw. Überwachung der Spermatogenese eignet. Ein solches Verfahren umfaßt die Bestimmung von CREM und/oder CREM-abhängigen Proteinen, z.B. Proacrosin, Protamin, Tp-1, MCS und RT7.

Für die Bestimmung von CREM und/oder CREM-abhängigen Proteinen können übliche Verfahren verwendet werden. Günstig ist es, mittels PCR-Verfahren zu bestimmen, ob die für CREM und/oder CREM-abhängige Proteine kodierenden DNA-Sequenzen Mutationen aufweisen. Ferner bietet sich an, Punktationen am Hoden durchzuführen, um bevorzugt Spermatiden und besonders bevorzugt runde Spermatiden von Hoden zu untersuchen und die Expression von CREM und/oder CREM-abhängigen Proteinen zu bestimmen. Hierfür können CREM und/oder CREM-abhängige Proteine in einer Western-Blot-Analyse bestimmt werden, in der Antikörper gegen die einzelnen Proteine verwendet werden. Auch kann die mRNA von CREM und/oder CREM-abhängigen Proteinen in einer Northern-Blot-Analyse bestimmt werden, in der DNAs der einzelnen Proteine als Proben verwendet werden.

Erfindungsgemäß wird auch ein Kit bereitgestellt, der zur Bestimmung von CREM und/oder CREM-abhängigen Proteinen geeignet ist. Ein solcher Kit umfaßt:

ein oder mehr von (a) - (c)

- (a) Primer für eine Amplifikation von für CREM- und oder CREM-abhängigen Proteinen kodierender DNA,
- (b) Antikörper gegen CREM und/oder CREM-abhängige Proteine, z.B. Proacrosin, Protamin, Tp-1, MCS und RT7,
- (c) DNA-Proben für mRNA von CREM und/oder CREM-abhängigen Proteinen, z.B. Proacrosin, Protamin, Tp-1, MCS und RT7, sowie
- (d) Standards und Nachweisreagentien für ein oder mehr von (a) - (c), und
- (e) Träger sowie übliche Hilfsstoffe.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, die

Spermatogenese zu regulieren, d.h. eine gestörte Spermatogenese positiv zu regulieren, wodurch funktionsfähige Spermien gebildet werden, und eine normale Spermatogenese negativ zu regulieren, wodurch die Spermienbildung gehemmt wird. Die Regulierung der Spermatogenese ist reversibel, wodurch sich die negative Regulierung besonders zur Kontrolle der Fertilität eines männlichen Tieres, insbesondere des Mannes, eignet. Mit der vorliegenden Erfindung ist es ferner möglich, die Spermatogenese zu überwachen, was insbesondere wichtig ist, wenn regulierend eingegriffen worden ist.

K 2291

**Patentansprüche**

1. Pharmazeutische Zusammensetzung, geeignet zur Regulierung der Spermatogenese, umfassend:
  - (a) zur positiven Regulierung ein oder mehr Stoffe von CREM, einer CREM-phosphorylierenden Verbindung und einer die Expression von CREM-induzierenden Verbindung, und/oder
  - (b) zur negativen Regulierung ein oder mehr Stoffe von einer CREM-hemmenden Verbindung, einer die Phosphorylierung von CREM hemmenden Verbindung und einer die Expression von CREM hemmenden Verbindung.
2. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die CREM-phosphorylierende Verbindung eine Kinase ist, und die die Phosphorylierung von CREM hemmende Verbindung ein Kinase-Inhibitor ist.
3. Verfahren zur Untersuchung bzw. Überwachung der Spermatogenese, wobei CREM und/oder CREM-abhängige Proteine bestimmt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die CREM-abhängigen Proteine Proacrosin, Protamin, Tp-1, MCS und/oder RT7 sind.
5. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 3 oder 4, umfassend ein oder mehr von (a) - (c)
  - (a) Primer für eine Amplifikation von für CREM- und/oder CREM-abhängigen Proteinen kodierende DNA,

- (b) Antikörper gegen CREM und/oder CREM-abhängige Proteine,
- (c) DNA-Proben für mRNA von CREM und/oder CREM-abhängigen Proteinen, sowie
- (d) Standards und Nachweisreagenzien für ein oder mehr von (a) - (c), und
- (e) Träger sowie übliche Hilfsstoffe.

6. Kit nach Anspruch 5, adurch gekennzeichnet, daß die CREM-abhängigen Proteine Proacrosin, Protamin, Tp-1, MCS und/oder RT7 sind.

7. Verwendung von (b) der pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2 zur Fertilitätskontrolle beim Mann.

K 2291

**Zusammenfassung**

**Regulierung der Spermatogenese**

Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend

- (a) zur positiven Regulierung  
ein oder mehr Stoffe von  
CREM, einer CREM-phosphorylierenden Verbindung und  
einer die Expression von CREM-induzierenden  
Verbindung, und/oder
  
- (b) zur negativen Regulierung  
ein oder mehr Stoffe von  
einer CREM-hemmenden Verbindung, einer die  
Phosphorylierung von CREM hemmenden Verbindung und  
einer die Expression von CREM hemmenden Verbindung.

Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Untersuchung  
der Spermatogenese sowie einen hierfür verwendbaren Kit.

